

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO NA
REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO DIAGNOSTICADA
POR MEIO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

Ana Cândida Machado Saraiva

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de Ciências
Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

**Uberlândia – MG
Dezembro - 1999**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO NA REGIÃO DO TRIÂNGULO
MINEIRO DIAGNOSTICADA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

Ana Cândida Machado Saraiva

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho - Orientador

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Dezembro -1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO NA REGIÃO DO TRIÂNGULO
MINEIRO DIAGNOSTICADA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

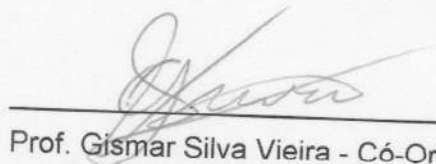
Ana Cândida Machado Saraiva

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 16 / 12 / 1999

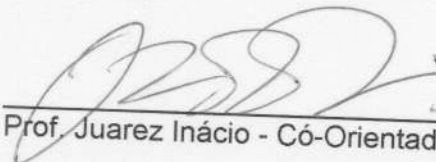
NOTA 100,00



Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho - Orientador



Prof. Gismar Silva Vieira - Có-Orientador



Prof. Juarez Inácio - Có-Orientador

Ana Maria Coelho
Universidade Federal de Uberlândia
Centro de Ciências Biomédicas
Prof. Ana Maria Coelho Carvalho
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia, 16 de dezembro de 1999.

Ao meu namorado Bruno,

Que se faz presente em todos os momentos de alegrias e tristezas, de esperanças e medos, de conquistas e derrotas, me dando força, carinho e principalmente me dando chance para aprender o que é AMAR.

Com todo meu amor, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Aos meus pais, João e Lêda,
Que sempre me criaram com muito
amor e carinho, me ensinando sempre
a lutar pelos meus objetivos. Palavras
não podem dizer o quanto é grande o
meu amor por vocês. Muito obrigado
por vocês existirem e principalmente
por me amarem.*

*Ao meu orientador Luiz Ricardo,
Por ter confiando em minha
capacidade para desenvolver este
trabalho e pela oportunidade de
ampliar meus conhecimentos. Muito
Obrigada.*

*Aos meus có-orientadores, Gismar e
Juarez, por terem aceito meu convite e
por terem sempre me ajudado na
construção do meu aprendizado.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me proporcionar a vida e sempre a iluminar, me guiando pelo caminho do bem.

Aos meus irmãos, Rodrigo, Pedro Paulo e Adriana pela presença constante.

À toda a minha família que com certeza contribuiu muito para que essa vitória acontecesse.

Às minhas sempre amigas, Ana Luiza e Adriana, que sempre estiveram presentes nos momentos difíceis e felizes, me ajudando, me ensinando e principalmente me alegrando pelo simples fato de existirem.

Aos amigos e colegas da 44ª Turma de Ciências Biológicas:

Fred, Fabiana, Henrique, Walter, Gilvan, Renatão, Renatinha, Polyana, Marcelle, Kally, Ana Cláudia, Jader, Fabrício, Idessânia, Noella, Simone, Pablo, Danilo, Ana Carolina, Adelhaid, Ioná, Grace, Selma, Welligton, André e Luciene pelos anos maravilhosos que passamos juntos, o que deixará muitas saudades.

Aos amigos do laboratório:

Jú Meola, Elizângela, Jaqueline, Waldesse, Juliana, Wânia, Bárbara, Maurício, Warlei, Kátia, Leo, Nádia, Renata, Karla, Fernando, Walter, Marcelo, Vivian e André pelos ensinamentos, alegrias e principalmente pelo crescimento científico.

“O encanto da vida depende
unicamente das boas amizades que
cultivamos.”

(Malba Taham)

Aos ginecologistas, Flávia Guedes e Roberto Galvão,
por terem cedido as amostras das pacientes para a realização deste trabalho.

A todos aqueles,
cujo os nomes foram esquecidos mas que com certeza fizeram parte desta vitória.

À Universidade Federal de Uberlândia,
pelo crescimento pessoal e profissional e pela oportunidade de me formar e me sentir como
uma Bióloga.

“A mente que se abre a uma nova
idéia nunca volta a forma
original.”

(Albert Einstein)

ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1- História da Infecção pelo HPV	3
2.2- Caracterização do HPV	4
2.3- Mecanismo de Infecção do HPV	6
2.4- HPV e Neoplasias Intraepiteliais Cervicais	7
2.5- Prevalência do HPV	8
2.6- Diagnósticos da Infecção pelo HPV	9
2.6.1- PCR	10
3- MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1- Material	11
3.1.1- Material Biológico	11
3.2- Métodos	11
3.2.1- Extração do DNA do Material Endocervical	11
3.2.2- Reação em Cadeia da Polimerase	12
3.2.3- Eletroforese em Gel de Agarose e Visualização da Amplificação	13
3.2.4- Análise Estatística	13
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5- CONCLUSÕES	21
6- LITERATURA CITADA	22
7- ANEXO	25

RESUMO

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus DNA que infecta a superfície do epitélio e membranas mucosas e que geralmente produz verrugas ou proliferações epiteliais nos locais inoculados. Estes vírus estão altamente associados às Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC) e à sua evolução para o câncer do colo uterino, que atinge 1 em cada 28 mulheres no Brasil. Vários são os métodos de diagnóstico para avaliar a presença do HPV. Porém atualmente a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é a técnica que apresenta maior sensibilidade, tendo capacidade de detectar uma cópia do DNA viral por grupo de até 10 células. Para determinar a prevalência do HPV na região do Triângulo Mineiro foram analisadas 80 amostras de DNA genômico, extraídos do material endocervical, e posteriormente diagnosticadas por meio da PCR para a presença do HPV, sendo que 42 amostras foram coletadas em um ambulatório periférico da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e 38 em um consultório particular situado no centro dessa mesma cidade. Dessas amostras 31 foram positivas para PCR o que representou 38,75% do número total de amostras analisadas. Das 42 amostras analisadas, provindas do ambulatório da UFU, 23 (54,76%) foram positivas para a presença do HPV. Já das 38 amostras do consultório particular apenas 8 (21,05%) foram positivas. Provavelmente esta diferença na prevalência do HPV ocorreu devido a falta de informação apresentada pelas pacientes do Ambulatório. A faixa etária que apresentou maior prevalência do HPV está entre 20 e 39 anos de idade. Das 14 pacientes (classificadas por meio dos exames citopatológicos) apresentando Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC), 12 foram positivas para a presença do HPV. Os dados acima mais a relação entre a presença do HPV e a classificação do Papanicolaou, ou seja, classe I (células normais), classe II (células com inflamações) e classe III (células atípicas), sugerem que a prevalência do HPV é alta e pode estar associada às NIC (como um forte cofator), podendo evoluir ou não para o câncer do colo uterino.

PALAVRAS CHAVE: HPV – NIC – PCR

1. INTRODUÇÃO

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus DNA epiteliotrópico que infecta a superfície do epitélio e membranas mucosas e que geralmente produz verrugas ou proliferações epiteliais nos locais inoculados (Lorincz and Reid, 1997). Podem estar presentes em diversas partes do corpo, tanto dos homens quanto das mulheres, porém, nas mulheres estes vírus estão altamente associados às neoplasias endocervicais, precursoras do câncer do colo uterino.

Acredita-se que a infecção pelo HPV é adquirida por meio do contato direto pele a pele, sendo que 25 a 65% dos indivíduos contaminam-se após o contato sexual com parceiros infectados (Halbe, 1986).

As partículas virais infectam as células metaplásicas cervicais, que lhes são suscetíveis e desencadeiam um processo de hiperplasia de células basais, que podem desencadear processos neoplásicos (de Brux, 1983), mas segundo Jenson *et al.*, 1987, o tipo de HPV parece ter importância na localização anatômica, na aparência clínica e na história natural das lesões. Desta forma, os tipos 16 e 18 são considerados como HPV de alto risco para o desenvolvimento de carcinomas, já os tipos 6 e 11 são de baixo risco. Assim, estes vírus estão associados tanto às neoplasias benignas quanto às malignas. Essas neoplasias estão associadas à expressão de dois genes do genoma viral da região codificante inicial, E6 e E7, responsáveis pela produção das proteínas oncogênicas que atuarão nos processos neoplásicos (Chen, 1994).

Há mais de uma década que técnicas de detecção molecular e vários métodos de hibridação revelaram as primeiras informações da associação de certos tipos de HPV com o câncer do colo uterino. No entanto, quando métodos tão sensíveis quanto a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tornaram-se disponíveis, pode-se perceber que a infecção por HPV

estava mais dispersa do que se pensava anteriormente e isso possibilitou o esclarecimento do papel etiológico do HPV no câncer genital (McCance, 1998).

Estes vírus estão entre os principais cofatores do câncer endocervical, que é uma rara moléstia maligna que obtém cura de 100% se diagnosticada em suas formas iniciais. Porém quando não tratado é responsável por 15% dos óbitos de câncer em mulheres acima dos 15 anos (Halbe, 1995).

Desta maneira fica explícita a importância deste trabalho que tem como objetivo analisar a prevalência do HPV, na Região do Triângulo Mineiro, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que hoje se mostra como a técnica que apresenta maior sensibilidade, rapidez e precisão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. História da Infecção

O grande conhecimento desenvolvido na área do câncer do colo do útero, desde Hinselmann com a colposcopia e Schiller com o teste de iodo, ambos na década de 20, assim como os estudos de George Papanicolaou nas décadas de 30 e 40, foram centrados no carcinoma epidermóide porém, hoje já se sabe que o carcinoma mais freqüente, que ocorre no colo do útero, é o escamoso (Silveira and Pessini, 1993), sendo que o Papilomavírus Humano (HPV) está presente em 90% desse tipo de câncer (Galloway, 1994).

Antigamente, problema como resultado falso-negativo, decorrido muitas vezes de análises de partes de tecidos não contaminados com o vírus HPV e a necessidade da caracterização de infecção latente, que seria aquela que apesar de ter a presença do agente etiológico não apresentava alterações morfológicas e/ou clínicas no hospedeiro, se expressavam. Porém com o avanço de métodos de diagnósticos como as técnicas de Biologia Molecular (Hibridação e principalmente a Reação em Cadeia da Polimerase - PCR) as análises feitas para detecção do vírus puderam se tornar mais específicas e sensíveis (Cuzick *et al.*, 1994).

Vários autores contribuíram, acompanhando e relatando os casos de ocorrências de infecções pelo Papilomavírus Humano, mostrando que existem cerca de 70 tipos de HPV, 40 destes afetam a região urogenital. O HPV 16, 18, 45 e 31 nesta ordem são os mais freqüentemente encontrados no câncer cervical, sendo, portanto considerados como de alto risco. Já os tipos 6 e 11 são vírus considerados de baixo risco (Galloway, 1994).

2.2. Caracterização do vírus HPV

Baseados na estrutura do capsídeo e na constituição do DNA viral, desprovido de membrana lipídica, classificaram o Papilomavírus Humano na família *Papovaviridae* e no gênero *Papillomavirus* (Matthews, 1982).

Os Papilomavírus (PV) contêm um capsídeo icosaédrico, composto de 72 capsômeros, que mede cerca de 55nm de diâmetro; o capsídeo é constituído apenas por proteínas, que são responsáveis por 88% do peso do vírus (Melnick *et al.*, 1974).

Correspondendo a 12% do peso do Papilomavírus, encontramos o genoma do mesmo, que é constituído por molécula única de DNA de fita dupla, circular, superespiralada quando isolada das proteínas nucleares, com tamanho aproximadamente de 7,9 Kb e peso molecular de 5.106 Daltons (Fuchs *et al.*, 1986).

As diferentes espécies animais possuem tamanho e posições relativas similares do DNA viral, que é constituído de unidades transcricionais (seqüências codificantes) e de seqüências não codificantes (Pfister and Fuchs, 1987).

As seqüências codificantes do DNA viral, também chamadas *open reading frames* (ORF), são agrupadas em duas regiões (inicial e tardia), estas por sua vez são separadas por uma pequena seqüência não codificante e por uma região de controle longa (LCR) (Figura 1), onde estão contidas as origens da replicação, além de ser a região que controla a expressão dos genes virais (Syrjanen, 1987).

Rapidamente no início da infecção, os genes da região inicial (*early*), que correspondem 60% do genoma viral, são expressos através de promotores localizados na LCR, antes mesmo da replicação do DNA. A replicação e a expressão do DNA viral são, então, controlados pelos genes *early* por meio de seus produtos com funções específicas (Pfister and Fuchs, 1987).

Já os genes tardios (*late*), segundo Pfister & Fuchs (1987) codificam proteínas estruturais da partícula viral e a expressão dos mesmos é observada apenas em células maduras, embora, o DNA do vírus possa ser encontrado em células parabasais.

Nos diferentes Papilomavírus podem ser encontradas até 8 seqüências codificantes iniciais, porém apenas 5 (E1, E2, E4, E6 e E7), são conservadas em todos Papilomavírus.

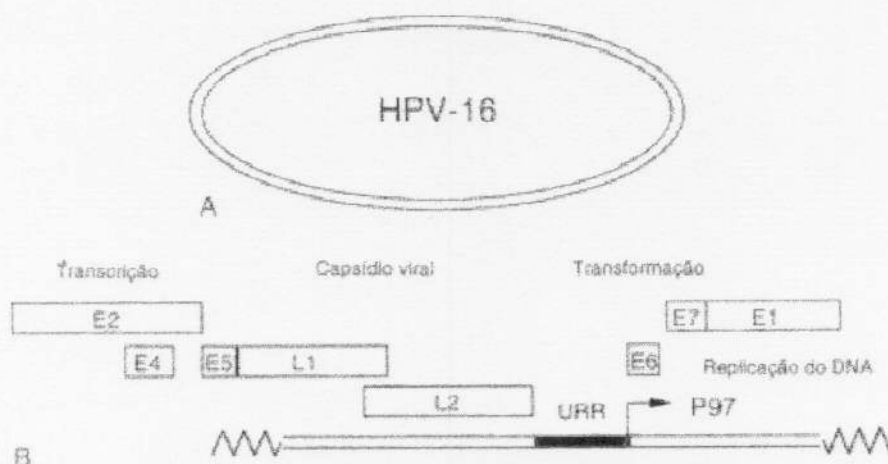


Figura 1. Estrutura do genoma do HPV16. A, Nas lesões cervicais benignas e pré-malignas, persistem como DNA circular não integrado a célula hospedeira. B, Nos carcinomas cervicais, integram-se ao DNA da célula hospedeira.

Fonte: Lorincz and Reid, 1997. p. 149.

Acredita-se que a expressão destas seqüências está, de algum modo, intimamente relacionada com o potencial tumorigênico destes vírus (Danos *et al.*, 1984).

As proteínas multifuncionais, que têm atividade moduladora da replicação viral e da transformação celular são E6 e E7, sendo também importantes no aparecimento e provavelmente, na manutenção do fenótipo transformado de células infectadas pelo HPV (Hudson *et al.*, 1990).

A transcrição de E6 e E7 é maior em linhagens tumorais mais agressivas e em displasias de mais alto grau de malignidade, sendo necessária uma cooperação do E7 e do E6 o suficiente para imortalização e alteração do padrão de diferenciação dos queratinócitos cervicais, que são as células-alvo do HPV (Hudson *et al.*, 1990).

A proteína codificada por E7 do HPV 16, um dos tipos mais freqüentemente associados com lesões malignas, é capaz de se ligar ao gene do retinoblastoma, que é um gene celular com atividade supressora sobre tumores, que também atua no crescimento celular normal e cujo produto é a p105RB. Já a proteína codificada pelo gene E6 é capaz de interagir com a p53, uma proteína de origem celular que também possui propriedade supressora sobre tumores. Desta forma, E6 e E7 favorecem a divisão celular interrompendo os mecanismos de regulação celular (Salas and Bayghen, 1995).

O papel transformante de E5 não é muito claro, mas é possível que ela possa induzir proliferação celular durante a fase inicial da infecção viral. E4, embora localizada junto das

seqüências iniciais, parece ter ação apenas na maturação viral. E3, não tem ainda função determinada e não está presente em todos HPV, inclusive nos tipos 16 e 18 que são os mais comumente encontrados em lesões malignas dos carcinomas cervicais. A proteína E2 impede a transcrição temporária e confere especificidade de união a E1, a qual promove a replicação viral logo após a penetração do vírus na célula (Salas and Bayghen, 1995).

A organização da região tardia é muito mais simples do que a da inicial. Existem apenas duas seqüências grandes que codificam duas proteínas estruturais do vírion: L1, o componente principal do capsídeo, gênero - específico e L2, um componente menos abundante do capsídeo, tipo-específico. L1 é altamente conservada entre as espécies humana e de outros animais. Na maioria dos condilomas acuminados já analisados os antígenos virais capazes de provocar resposta imunitária são codificados por L1 (Syrjanen, 1987).

2.3. Mecanismo de Infecção do HPV

No tecido epitelial, escamoso e glandular de diferentes localizações são identificados os HPVs, porém o efeito destes vírus no epitélio escamoso é mais conhecido, principalmente em áreas genitais masculina e feminina (Abrão *et al.*, 1994).

O DNA do vírus, através de microtraumas ou quando expostos aos epitélios imaturos, metaplásicos (preferidos pelo vírus) ou alterados por processo inflamatório, infectam o epitélio escamoso utilizando para isto as células profundas do mesmo, pelo fato de que nele existe toda maquinaria necessária para a replicação da qual o vírus é dependente. A entrada do HPV nas células parece ser mediada pela ligação de proteínas do capsídeo viral e receptor celular (Abrão *et al.*, 1994).

O vírus do papiloma não produz brotamento a partir da membrana celular, não possuindo portanto envelope lipídico, mas em compensação uma cobertura protéica que lhe permite continuar infeccioso fora das células por algum tempo (Androphy, 1989).

O curso da infecção depende da ação de componentes do vírus e do comportamento das células afetadas, permissivas ou não-permissivas, isto é, aquelas que permitem ou não a formação de partículas virais completas. Dependendo da interação desses fatores, surge infecção latente ou lesão clinicamente visível. Se a infecção ocorrer em células permissivas, ocorrerá replicação limitada, estável e sincrônica do DNA viral através da multiplicação do DNA. Assim todas as células filhas terão um número suficiente de cópias para manter a infecção de forma latente (Smotkin, 1989).

O estado latente é sugerido pela presença do DNA do vírus em 2 a 40% das amostras de esfregaços endocervicais normais ou em tecidos normais e próximos a lesões do colo uterino (Fuchs *et al.*, 1987).

Quando uma célula basal é infectada, a expressão dos genes virais provoca uma resposta anormal, que altera a divisão celular. Aumentam o número de células germinativas, formam-se papilas, ocorre hiperplasia da camada espinhosa (acantose) e cornificada (hiperceratose) e anormalidades na diferenciação celular (paraceratose). Depois desta fase os vírus são liberados com as células mortas que descamam, sendo isto o que existe de menos prejudicial ao organismo infectado (Smotkin, 1989).

Porém quando a infecção ocorre em células não-permissivas, partículas inteiras do vírus não são encontradas em lesões malignas, pois as células cancerosas perdem progressivamente a capacidade de diferenciação. O número de cópias do genoma viral também é menor e as vezes se encontra integrado ao genoma celular (Reid and Campion, 1989).

Segundo Reid & Campion (1989), “quando isso acontece, a quantidade de material genético se torna aneuplóide e, sucessivamente, aparece o aspecto displásico: a célula caminhou alguns passos em direção à transformação maligna”.

A infecção viral pode permanecer como condiloma, pode regredir ou evoluir para neoplasia intra-epitelial cervical, dependendo para tanto, da ação de múltiplos cofatores (Dexeus and López, 1989).

2.4. HPV e Neoplasias Intraepiteliais Cervicais

As neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) são lesões consideradas precursoras do câncer de colo uterino, sendo assintomáticas, não podem ser diagnosticadas pelo exame clínico, e sim através de biópsias e conseqüente estudo histopatológico. Os estudos visando diagnóstico das NIC indica que a citologia oncótica possui maior valor no diagnóstico de NIC grau III e a biópsia já é usada para diagnosticar as NIC grau I e II (Focchi *et al.*, 1987).

Desde 1970, tem havido aumento de NIC I, II e III juntamente com a infecção pelo HPV, que atualmente é encontrado em 90% dos cânceres cervicais examinados (Galloway, 1994).

Estas neoplasias intraepiteliais cervicais, ou seja, as formas pré-invasivas do câncer do colo do útero, originam-se em células metaplásticas imaturas que se alteram, provavelmente, devido a uma associação de fatores: agentes oncogênicos, perturbações imunitárias e características epidemiológicas. A maturação fisiológica das células ocorre na maioria das mulheres, mas quase sempre é perturbada por um intruso, o HPV, resultando numa zona de

transformação anormal, que não se sabe se permanece a mesma lesão até a cura ou se esta lesão se torna mais agressiva (Pereyra and Guerra, 1995).

Os fatores que provavelmente estão envolvidos na origem das NIC e do câncer do colo são:

- Epidemiológicos: precocidade de relações sexuais, múltiplos parceiros, gestação precoce, parceiro de alto risco, DST.
- Fatores potenciais ou cofatores: imunidade, anticoncepcional oral (ACO), tabagismo, radiação prévia, vitaminas A e C.
- Relações virais: **HPV** e HSV (Silveira and Pessini, 1993).

Pode-se considerar que nem todas as NIC progridem, sendo provável que as que regredem têm fatores etiológicos pouco agressivos, como o HPV 6 e o HPV 11, que são encontrados não-integrados no interior do genoma da célula hospedeira, sendo considerados de baixo risco. Já as que progridem contêm os tipos 16, 18, 30, 31, 33, 34 e 35 que freqüentemente estão integrados ao genoma da célula hospedeira, sendo considerados vírus de alto risco (Broker, 1987).

Para Syrjanen (1989), as infecções que contêm o HPV 16 são as que apresentam maior risco de progressão clínica. Mas dependendo do *status* imunológico do hospedeiro, o mesmo tipo de HPV poderá determinar neoplasias benignas ou malignas, sendo que a última poderá evoluir para o câncer do colo uterino.

2.5. Prevalência do HPV

A prevalência do HPV varia, dependendo da população rastreada, com a maior prevalência sendo encontrada na população mais jovem, na qual a introdução recente do vírus é mais provável. A análise de 1,264 biópsias cervicais consecutivas do ano de 1972 com prevalência original de 0,7% obtiveram 36,5% de prevalência da infecção por HPV. Já no ano de 1982, em 965 biópsias, observaram prevalência de 34%. Desta forma, concluíram que a prevalência da infecção pelo HPV permanece estável há mais de 10 anos (Bernstein *et al.*, 1985).

Serviços vinculados à Secretaria Municipal de Saúde de São Gonçalo (RJ), mostraram que em 1983 foram atendidos 52 casos de condilomas acuminado sendo que 10,21% tinham a presença do HPV. Em 1987, de 195 casos, 17,34% tinham a presença do HPV. Já no ano de 1989 os dados até junho mostraram o atendimento de 123 pacientes com condiloma acuminado, 20,54% eram causados pelo HPV (Jacyntho *et al.*, 1994).

Estimativas verdadeiras da prevalência são difíceis, pois a otimização dos métodos de diagnóstico e identificação virótica, para detectar infecções subclínicas em mulheres e homens, pode modificar os dados estatísticos disponíveis. A distribuição demográfica e os determinantes comportamentais do grupo em estudo também podem estar envolvidos na determinação da prevalência do HPV (Wheeler, 1996).

É provável que atualmente as infecções sejam mais frequentes que as clinicamente aparentes. No entanto, a sensibilidade e a especificidade da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permite um melhor rastreamento da presença desse vírus (Jacyntho *et al.*, 1994).

2.6. Diagnósticos da Infecção pelo HPV

Por ser espécie-específico, os HPV não infectam animais de laboratório nem podem ser isolados de amostras clínicas por meio de cultura de células, uma vez que exigem diferenciação celular para suas replicações, assim não há testes sorológicos adequados para detecção dos mesmos. Apesar de partículas virais poderem ser detectadas pela microscopia eletrônica e por técnicas de imunocitoquímica, nenhum destes métodos é suficientemente sensível para identificar as infecções não permissivas, isto é, aquelas que não produzem partículas virais completas, além de serem pouco sensíveis mesmo para as infecções permissivas que produzem poucas partículas, como é o caso das lesões genitais (Schneider, 1987).

Os métodos mais usados para detecção do HPV são: o exame clínico, evidente no caso do condiloma acuminado; a colposcopia, vantajosa para lesões subclínicas; a citologia, que revela as alterações celulares produzidas pelo vírus e a biópsia, que, no entanto, necessita ser dirigida pela colposcopia e também não detecta as infecções latentes. Devido ao baixo custo e a facilidade de execução, estes métodos são adequados para o rastreamento populacional, apesar de não detectarem infecção latente nem o tipo viral (Murdoch *et al.*, 1988).

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, a molécula do DNA que era antes uma molécula difícil de ser analisada, passou a ser a mais simples de se estudar. Agora é possível diagnosticar, de maneira mais adequada e sensível, a presença do DNA do vírus HPV, essencial para qualquer tipo de infecção (Schneider, 1987).

Os avanços nesta área só foram possíveis por meio de vários campos do conhecimento científico, como: genética, bioquímica, virologia, a história da descrição da molécula do DNA, por Watson e Crick em 1953, passando pela descoberta da propriedade de denaturação e renaturação, das técnicas de clonagem do DNA, do sequenciamento do DNA, da transferência do DNA em gel de agarose para membranas de nitrocelulose ou de náilon, que

se transformou no padrão-ouro para diagnosticar o HPV (Southern, 1975) que exige altas quantidades de DNA, dos tipos de HPV implicados nas diferentes lesões genitais e finalmente da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que atualmente é o método mais sensível para diagnosticar a presença do HPV (Saiki *et al.*, 1988).

2.6.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Tornava-se necessário, um teste rápido, sensível e específico, que tivesse a capacidade de detectar a presença do agente infeccioso (HPV), sem a necessidade de cultura e independente da resposta imune. Esta técnica é exatamente a PCR (Polymerase Chain Reaction), criado por Kary Mullis, em 1985, nos USA, o exame é uma reação enzimática que detecta quantidades ínfimas de DNA (ácido desoxirribonucléico). A reação de polimerase em cadeia (PCR) vem mudando profundamente as práticas de pesquisa nas áreas de biologia molecular, genética e medicina. Em 1993, Kary Mullis recebeu o Prêmio Nobel de Medicina pela PCR, apenas oito anos depois de sua invenção (Abrão *et al.*, 1994).

Os fundamentos e a execução da PCR são simples. Uma amostra biológica é misturada a dois “primers” (fragmentos pequenos de DNA específico para o gene de interesse), o aquecimento e o resfriamento desta mistura leva a denaturação da fita dupla do DNA inicial e o anelamento dos “primers”, caso o gene relevante ou região genômica esteja presente na amostra. Posteriormente se houver o anelamento dos “primers” (iniciadores), a enzima polimerase, que é um dos reagentes necessários na reação, copia o gene em questão. A repetição de ciclos de denaturação, a ligação dos iniciadores e a produção de novas cópias resultam aproximadamente em um bilhão de novas cópias do gene (Abrão *et al.*, 1994).

Deste modo a técnica da PCR trouxe considerável aumento na sensibilidade dos métodos utilizados, permitindo a detecção do HPV em grupos de até 10 células (White *et al.*, 1989).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Material Biológico

As amostras de material endocervical, após o consentimento dos pacientes (Anexo 1), foram coletadas por ginecologistas, parte no ambulatório periférico da Universidade Federal de Uberlândia e parte em um consultório particular situado no centro da mesma cidade. Portanto as pacientes analisadas apresentavam condições sociais distintas.

O material endocervical foi coletado ao acaso por meio de *swabs* cervicais, que foram colocados em tubos estéreis contendo 1ml do Tampão de lise nuclear - TLN (Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM e NaCl 400 mM) sendo em seguida identificado com o nome de cada paciente. Posteriormente estes foram encaminhados ao Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, aonde foi realizada a pesquisa.

Cada amostra recebeu uma numeração para facilitar o desenvolvimento da pesquisa. Estas foram guardadas em câmara fria até a realização da extração do DNA.

3.2. Métodos

3.2.1. Extração do DNA do material endocervical

As amostras foram retiradas dos tubos já numerados e colocadas em *eppendorf* (1,5 ml) igualmente numerados, para realização da extração do DNA. Em cada *eppendorf* foi colocado 1 ml do Tampão TLN contendo a amostra do material endocervical, 20 µL de proteinase K e 10 µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), para auxiliar na degradação das proteínas, que em altas quantidades influenciam na qualidade do DNA a ser extraído.

Estas foram incubadas em banho maria à 60°C *overnight*. Em seguida foi acrescentado 1/3 do volume da amostra de NaCl saturado deixando por 10 minutos no freezer. Posteriormente foram centrifugadas à 15.000 rpm durante 15 minutos para precipitar os debris celulares. O líquido sobrenadante foi pipetado para um novo *eppendorf* devidamente numerado, sendo em seguida acrescentado 2 X do volume da amostra de etanol absoluto e centrifugado à 15.000 rpm durante 15 minutos para precipitar o DNA. Os peletes de DNA precipitados foram lavados com etanol 70% e posteriormente ressuspensos em 50 µL de água deionizada. Estes foram estocados no freezer para posterior realização da PCR.

3.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

Após a extração do DNA foi realizado a PCR, que consiste em uma técnica extremamente sensível, rápida e específica, capaz de detectar partículas ínfimas do DNA do vírus HPV.

A metodologia empregada foi aquela descrita segundo Innis *et al.* (1990). A amplificação pela PCR (Aparelho de PCR da *Md Research*) foi feita com a utilização de dois *primers* degenerados MY09 (CGTCCMRRGGAWACTGATC) e MY11 (GCMCAGGGWCATAAYAATGG) onde M= A+C, R=A+G, W=A+T e Y= C+T. Os *primers* anelam na sequência L1 do genoma do HPV, amplificando um fragmento de aproximadamente 450 pares de bases (pb).

Cada reação de PCR continha 5 µL de DNA genômico, 7,5 pmoles de cada *primer*, 10mM de cada dNTP, 1,5 mM de Cloreto de Magnésio, 2,5 µL de Tampão da Taq-DNA polimerase e 1 unidade da enzima Taq-DNA polimerase, em um volume final de reação de 25 µL.

O programa utilizado na PCR (35 ciclos) foi o seguinte:

Programa	Temperatura	Tempo
Desnaturação	94	40''
Anelamento dos primers	58	40''
Extensão	72	40''
Extensão Final	72	5'

Para maior confiabilidade quanto ao resultado da PCR todas as reações foram repetidas por duas vezes e só depois confirmado o diagnóstico.

3.2.3. Eletroforese em Gel de Agarose e Visualização da amplificação

As amplificações foram corridas em Gel de Agarose 1,5% (1,5g de Agarose em 100 ml de Tampão TBE) e Tampão de gel de eletroforese de TBE 0,5X (TRIS-HCl, EDTA e Ácido Bórico), (Sambrook *et al.*, 1989).

O Gel foi submetido a uma voltagem constante de 100 volts. Após 1:30 h de corrida, o gel foi levado à luz ultravioleta para observação das bandas e posteriormente ao VDS para realização das fotografias.

3.2.4. Análise Estatística

A análise estatística foi feita comparando as amostras dos diferentes locais de coleta (ambulatório da UFU e consultório particular), por meio do Teste Exato de Fisher, com objetivo de verificar se estas amostras podem ser consideradas independentes ou não.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DNA genômico (Figura 2) após a extração se manteve preservado e com boa qualidade, sendo isto um fator importante na análise por meio da PCR. Pode-se observar que algumas extrações apresentaram maior quantidade de DNA genômico, uma vez que as diluições dos peletes de DNA foram padronizadas.

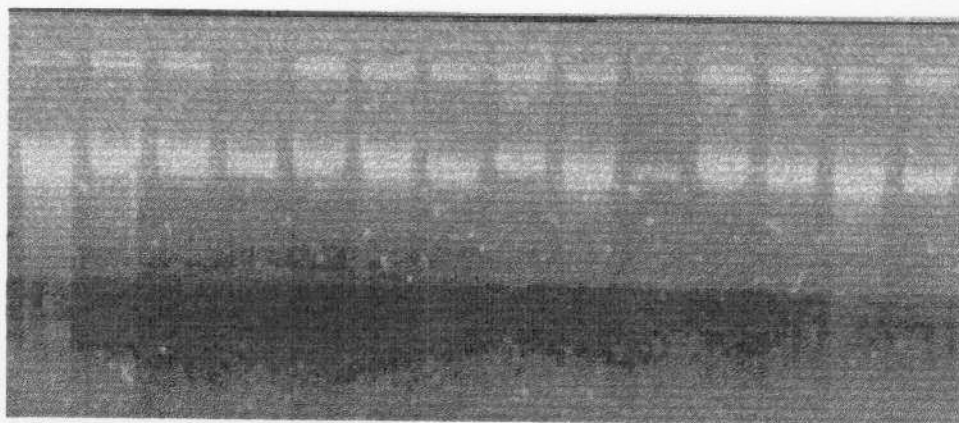


Figura 2. Padrão eletroforético do DNA genômico extraído dos materiais endocervicais.

Os resultados das amplificações pela PCR (Figura 3), exames citopatológicos e a idade de cada paciente estão representados nas Tabelas 1 e 2, sendo que a Tabela 1 apresenta as pacientes do ambulatório da UFU e a Tabela 2 as do consultório particular.

Todas as pacientes que apresentaram um fragmento de mais ou menos 450 pares de bases (pb), que é o tamanho da sequência (L1 do capsídeo viral) que os *primers* degenerados amplificam, foram considerados como positivos para a presença do HPV.

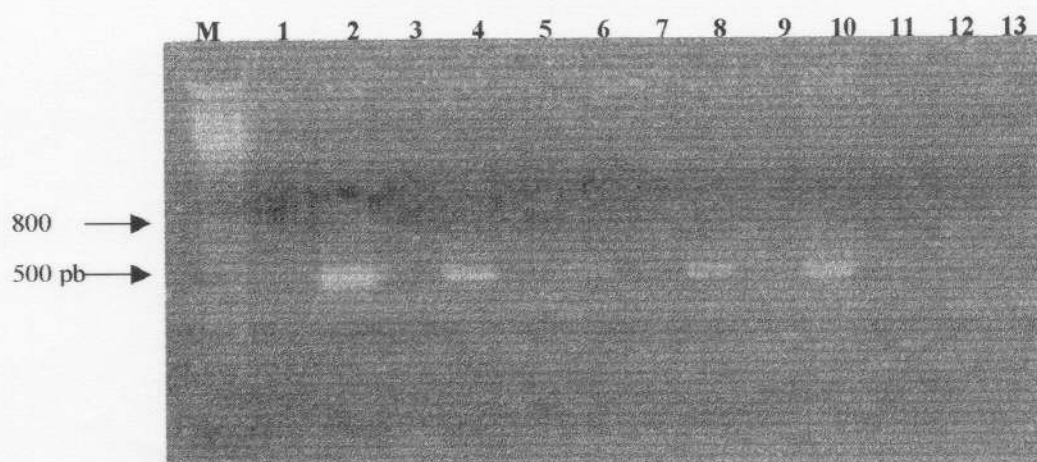


Figura 3 Amplificação pela PCR das amostras de material endocervical indicando presença e ausência do HPV. M (marcador); Colunas 1, 3, 5, 7, 9 e 12 (ausência); Colunas 2, 4, 6, 8, 10 e 11 (presença); Coluna 13 (controle com ausência de DNA).

TABELA 1. Dados das pacientes do ambulatório da Universidade Federal de Uberlândia, comparando os resultados obtidos no exame citopatológico com os resultados obtidos através da técnica da PCR.

PACIENTE	IDADE	RESULTADO CITOPATOLÓGICO	RESULTADO PCR
E.M.A	43	classe II	-
S.M.S.	30	classe III / NIC III	+
A.V.C.	34	-	-
M.M.O	32	classe III / NIC III	+
M.L.S.	31	classe III / NIC I	+
K.A.F.	20	-	-
I.R.A	26	classe III / NIC I	+
S.S.L.G.	33	classe III / NIC III	+
S.R.M.	36	classe III / NIC III	+
L.A.S.	21	classe II	-
A.J.C.	37	classe III	+
E.C.J.	48	classe II	-
L.L.M.S.	34	classe II	+
M.C.D.C.	-	-	+
M.C.B.M.	37	classe III / NIC III	+
G.S.	20	classe II	+
F.J.C.	43	-	-
M.F.M.	31	classe II	-
D.G.S.	16	-	+
N.G.S.	38	-	-
R.T.B.D.	28	classe II	-
N.C.C.	34	classe II	-
J.D.F.R.	40	classe III / NIC I	+
D.B.B.	42	classe II	-
M.D.D.	-	-	-
G.B.R.	63	-	-
C.F.F.S.	19	classe III / NIC II	-
G.C.A	22	classe III	+
A.S.A	26	classe III / NIC I	+
N.O.B.	39	classe III / NIC III	+
M.E.C.O	56	classe II	+
C.R.O	29	classe II	-
M.I.O	30	classe II	-
R.A.B.	35	-	+
C.F.M.	26	classe III	+
E.M.R.	-	-	+
B.N.	39	Classe III/ NIC I	-
M.N.A	27	-	+
A.M.A.A	-	classe II	-
D.A.V.	22	classe II	+
W.R.R.	-	-	+
D.A.V.	-	-	-

TABELA 2. Dados das pacientes de um consultório particular (Uberlândia - MG), comparando os resultados obtidos através de exames citopatológicos com os obtidos pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

PACIENTE	IDADE	RESULTADO CITOPATOLÓGICO	RESULTADO PCR
F.G.P.	-	-	-
E.M.	25	classe I	-
V.A.T.	22	classe II	-
S.M.T.	27	classe I	-
S.S.B.	28	classe I	+
R.M.P.	21	classe II	-
M.C.S.	26	classe II	-
A.L.N.B.P.	22	classe II	+
T.P.	21	classe I	-
F.M.	24	classe II	-
M.V.	39	classe II	-
D.B.	18	classe II	-
J.F.B.	20	-	-
J.V.	26	classe I	-
C.T.B.	21	classe III / NIC I	+
G.H.F.	32	-	-
R.Y.	30	classe II	-
M.C.O.	66	classe II	-
J.O.	19	classe II	-
P.R.	27	classe II	-
C.T.	27	classe I	-
N.G.	48	-	-
E.F.	32	classe II	-
F.S.S.	25	classe II	+
S.H.	19	-	-
M.M.P.	30	classe II	-
J.M.	25	classe I	+
M.S.	23	classe II	-
P.S.	20	classe II	-
D.N.	48	classe I	-
A.G.	21	classe II	+
L.S.	25	classe II	-
S.A.	26	classe II	+
N.B.	38	classe II	-
D.S.	33	classe II	-
P.N.	32	classe I	+
A.P.	31	classe II	-
M.C.S.	25	classe II	-

Das 80 amostras de DNA analisadas por meio da PCR, 31 apresentaram resultado positivo para a presença do HPV ou seja, 38,75% da população analisada foram positivas (Tabela 3).

TABELA 3. Distribuição do HPV detectado por meio da PCR nas pacientes analisadas.

Resultado da PCR	Numero de pacientes	Porcentagem (%)
Positivo	31	38,75%
Negativo	49	61,25%
TOTAL	80	100%

Destas amostras positivas, 23 foram coletadas no ambulatório da UFU e apenas 8 foram coletadas no consultório particular (Tabela 4). Portanto, 54,76% das amostras coletadas no ambulatório da UFU foram positivas para o HPV enquanto que no consultório particular, apenas 21,05% apresentaram positividade para a presença do vírus. O Teste Exato de Fisher foi significativo com o valor de p igual à 0,0295, indicando que existe diferença da prevalência do HPV entre os locais de coleta das amostras do material endocervical.

Nos Estados Unidos a prevalência do HPV parece estar relacionada com a baixa condição socioeconômica (Wheeler, 1996). Os dados desta investigação também sugerem a condição de baixa renda como fator associado à maior prevalência do HPV.

TABELA 4. Associação dos resultados positivos para o HPV entre as pacientes do Ambulatório da Universidade Federal de Uberlândia e as pacientes do consultório particular (Uberlândia – MG).

Local da colheita das amostras	Número total de pacientes analisadas	Resultados positivos para a presença HPV	Porcentagem relativa de resultados positivos (%)	Teste Exato de Fisher
Ambulatório UFU	42	23	54,16%	P= 0,0295
Consultório Particular	38	8	21,05%	
TOTAL	80	31	38,75%	

Provavelmente, esta diferença ocorreu devido às condições sociais distintas apresentadas pelas pacientes que frequentam o ambulatório da UFU e o consultório particular. A infecção crescente pelo vírus do papiloma humano em mulheres com baixa condição socioeconômica está diretamente associada a precocidade e multiplicidade de relações sexuais e parceiros, a falta de informação, a não utilização de métodos contraceptivos, a baixa frequência de acompanhamento médico frequente e menor higiene pessoal.

O resultado positivo obtido por meio da PCR, o qual representa positividade à presença do HPV, não significa que a paciente irá desenvolver câncer do colo uterino, pois estes vírus

podem ser de alto ou baixo risco. Mas sabe-se hoje, que em 90% dos casos de câncer do colo uterino o vírus do papiloma humano está presente (Galloway, 1994).

Analisando as Tabelas 1 e 2 pôde-se perceber que a faixa etária em que ocorre maior número de casos positivos está entre 20 e 29 anos de idade, representando 16,25% da população total analisada e 48,15% dos resultados positivos para a PCR. Em segundo lugar está a faixa etária entre 30 e 39 sendo responsável por 40,74% dos resultados positivos para PCR (Tabela 5).

TABELA 5. Relação entre os resultados da PCR positivos para o HPV e a faixa etária das pacientes.

Faixa Etária	Número total de pacientes	Número de pacientes positivos para a PCR	Frequência acumulada dos resultados positivos (%)
10 - 19	5	1	3,70%
20 - 29	32	13	48,15%
30 - 39	25	11	40,74%
40 - 49	7	1	3,70%
50 - 59	1	1	3,70%
60 - 69	2	0	0%
TOTAL	72	27	100%

Chuang *et al.* (1984), em estudos epidemiológicos de 746 indivíduos de ambos os sexos, verificou que mais do que 80% dos pacientes apresentando infecções por HPV estavam entre 17 e 33 anos de idade. Os resultados deste trabalho mostram que mais de 88,89% das amostras de pacientes positivas para a presença do HPV por meio da PCR estão entre 20 e 39 anos de idade.

A relação entre a presença dos diferentes graus de neoplasias, resultado dos exames citopatológicos (realizados no Ambulatório da Faculdade de Medicina da UFU e em Laboratórios particulares) e os resultados diagnosticados por meio da PCR, mostram que de 14 amostras apresentando NIC, 12 destas (85,71%) foram positivas para o HPV (Tabela 6). Isto comprova que realmente este vírus é um cofator na gênese das Neoplasias que são precursoras dos cânceres cervicais.

TABELA 6. Relação entre os diferentes níveis de Neoplasias Intraepiteliais Cervicais e os Resultados dos Exames Citopatológicos e PCR.

NIC	Número de pacientes	Número de Resultados Positivos a PCR
NIC I	7	6
NIC II	1	0
NIC III	6	6
TOTAL	14	12

Relacionando também o número de casos positivos para PCR com a Classificação de Papanicolaou, observou-se que das 16 pacientes apresentando classe III (células atípicas - NIC) 13 (81,25%) apresentaram positividade para HPV por meio da PCR. Das 37 pacientes que apresentaram classe II (células com inflamação) apenas 8 (21,62%) foram positivas para a PCR. Já das 9 pacientes classificadas na classe I (células normais), 3 (33,33%) foram positivas.

Os dados acima sugerem que a prevalência do HPV é alta, podendo estar associados às NIC (como um forte cofator) que podem evoluir ou não para o carcinoma do colo uterino.

5. CONCLUSÕES

- ❖ Das 80 pacientes analisadas 38,75% foram positivas para presença do HPV por meio da PCR.
- ❖ Houve diferença significativa entre a prevalência do HPV no Ambulatório da UFU e no consultório particular, provavelmente devido à falta de informação, que pode ser resultado da diferença socioeconômica das pacientes analisadas.
- ❖ A faixa etária em que ocorreu maior prevalência do HPV está entre 20 e 39 anos, representando 88,89% dos resultados positivos.
- ❖ 85,71% das pacientes que apresentaram NIC foram positivas para PCR, indicando que realmente o HPV é um cofator necessário na gênese das neoplasias precursoras do câncer da cérvix.
- ❖ A presença do HPV em pacientes com classes I, II e III do papanicolaou mostra que estes vírus estão amplamente distribuídos e que a técnica empregada é realmente sensível, detectando a presença do HPV em pacientes diagnosticadas, por meio de exames citopatológicos, com ausência do HPV.

6. LITERATURA CITADA

- Abrão, F.S., Villa, L.L., Carvalho, F.M., Pereira, E.G., Focchi, J. and Abrão, M.S.** (1994). Critérios e conduta terapêutica das infecções pelo papilomavírus no trato genital inferior. *Femina*. 6-9: 381-388.
- Androphy, E.J.** (1989). Human papillomavirus. Current concepts. *Arch. Dermat.* 125: 683-685.
- Bernstein, S.G., Voet, R.I., Guxiek, D.S., Melancon, U.T., Roman-Cowen, L., Lifshitz, S. and Buschsbaum, H.T.** (1985). Prevalence of papillomavirus infection in colposcopically directed cervical biopsy specimens in 1972 and 1982. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 151: 577.
- Broker, T.R.** (1987). Structure and genetic expression of papillomaviruses. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* 14: 329.
- Chen, T.** (1994). The genotypes and prognostic significance of Human Papilloma Viruses in cervical cancer. *Int. J. Cancer.* 57: 181-184.
- Chuang, T.Y., Perry, H.O., Kurland, L.T. and Ilstrup, D.M.** (1984). Condyloma acuminatum in Rochester, Minn, 1950-1978. Epidemiology and clinical features. *Arch. Dermatol.* 120: 469.
- Cuzick, J., Terry, G., Ho, L., Hollingworth, T. and Anderson, M.** (1994). Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intrepithelial neoplasia. *Br. J. Cancer* 69: 167-171.
- Danos, O., Gira, J., Thierry, F. and Yaniv, M.** (1984). Papillomavirus genomes: sequences and consequences. *J. Invest. Dermatol.* 83: 7-11.
- de Brux, J., Orth, G., Crossant, O., Cochard, B. and Ionesco, M.** (1983). Lésion condylomateuses du col utérin: évolution chez 2.466 patients. *Bull Cancer.* 70: 140.

- Dexeus, S. and López, M.L.** (1989). Neoplasia Intraepitelial cervical. In: *Tratado Y Atlas de Patologia Cervical*, (Dexeus, S., López-Marin, L., Labastida, R. and Cararach, M. eds.). Sarvat Edit, Barcelona.
- Focchi, J., Leitzke, G. and Lima Filho, O.M.** (1987). Lesões precursoras do câncer do colo uterino - diagnóstico e tratamento. *J. Bas. Ginecol.* 97: 299-303.
- Fuchs, P.G., Iftner, T., Weninger, J. and Pfister, H.** (1986). Epidermodysplasia verruciformis - associated human papillomavirus 8: genomic sequence and comparative analysis. *J. Virol.* 58: 626-634.
- Galloway, D.A.** (1994). Human papillomavirus vaccines: a warty problem. *Infectious Agents and Diseases* 3: 187-193.
- Halbe, H.W.** (1995). *Tratado de Ginecologia*. Edit. Roca, São Paulo.
- Halbe, H.W. and Cunha, D.C.** (1986). Tratamento de condiloma acuminado. *Femina.* 15: 680.
- Hudson, J.B., Bedell, M.A., McCance, D.J., et al.** (1990). Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* 64: 519.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sininsky, J.J. and White, T.J.** (1990). *PCR Protocols - A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., N.Y.
- Jacyntho, C., Almeida-Filho, G. and Maldonado, P.** (1994). *HPV - Infecção genital feminina e masculina*. Editora Revinter. Rio de Janeiro -RJ.
- Lorincz, A.T. and Reid, R.** (1997). *HPV*. Interlivros. Rio de Janeiro.
- Mathews, R.E.F.** (1982). Classification and nomenclature of viruses. *Interviol.* 17: 1-199.
- McCance, D.J.** (1998). Human papillomaviruses and cervical cancer. *The Journal of Molecular Microbiology.* 47.
- Melnick, J.L., Allison, A.C., Butel, J.S., Eckhart, W., Eddy, B.E., Kit, S., Levine, A.J., Miles, J.A.R. and Vonka, V.** (1974). Papovaviridae *Intervirology.* 3: 106-120.
- Murdoch, J.B., Cassidy, L.J., Fletcher, K., Cordiner, J.W. and Macnab, J.C.M.** (1988). Histologic and cytologic evidence of viral infection and human papillomavirus type 16 DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia and normal tissue in the west of Scotland: evaluation of treatment policy. *Br. Med. J.* 296: 381-385.
- Pereyra, E.A.G. and Guerra, D.M.M.** (1995). Doenças Benignas do colo uterino. In: *Tratado de Ginecologia*, (Halbe, H.W. ed.). Roca, São Paulo.

- Pfister, H. and Fuchs, P.G.** (1987). Papillomavirus: particles genome organization and proteins. In: *Papillomavirus and Human Disease*, (Syrjanen, K.J. and Gissmann, L.G. eds.). Berlin, Springer.
- Reid, R. and Campion, M.J.** (1989). Human papillomavirus associated lesions of the cervix: biology and colposcopic features. *Clin. Obstet. Gynecol.* 32: 157-179.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.A., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.K. and Erlich, H.A.** (1988). Primer directed enzymatic amplification DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239: 487-491.
- Salas, L.M.A. and Bayghen, E.P.** (1995). Regulation genetica de los papilomavirus humanos genitales. *Salud Publica de Mexico.* 3: 240-247, 1995.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schneider, A., Meinhardt, G., De Villiers, E.M. and Gissmann, L.** (1987). Sensitivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV-DNA hybridization studies. *Diagn. Cytopathol.* 3: 250-255.
- Silveira, G.P.G. and Pessini, S.A.** (1993). Câncer de colo uterino: Lesões precursoras. In: *Tratado de Ginecologia*, (Halbe, H.W. ed.). Roca, São Paulo.
- Smotkin, D.** (1989). Virology of human papillomavirus. *Clin. Obstet. Gynecol.* 32: 117-126.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Syrjanen, K.J.** (1989). Epidemiology of human papillomavirus (HPV) infections and their associations with genital squamous cell cancer. *APMIS.* 97: 957.
- Syrjanen, K.J.** (1987). Biology of human papillomavirus infection and their role in squamous cell carcinogenesis. *Med. Biol.* 65: 21-39.
- Wheeler, C.** (1996). Human Papillomavirus type-specific Prevalence. [http:// hpv-web.lanl.gov/ COMPEDIUM_PDF/96PDF13/Wheeler.pdf](http://hpv-web.lanl.gov/COMPEDIUM_PDF/96PDF13/Wheeler.pdf)
- White, T. Y., Arhein, N. and Erlich, H.A.** (1989). The polymerase chain reaction. *Trends in Genetics.* 5: 185.

ANEXO I

Termo de Consentimento

O Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia está desenvolvendo pesquisa relacionada ao Papilomavírus Humano (HPV) que está sendo desenvolvida pelo Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho e sua orientada Ana Cândida Machado Saraiva.

O projeto inicial consiste na otimização de técnicas de Biologia Molecular para diagnosticar a presença ou não do vírus HPV, determinar a carga viral e diferenciar os tipos de vírus presentes no pacientes.

Os HPVs estão entre os principais cofatores das neoplasias intraepiteliais cervicais (câncer do colo uterino), que são uma das raras moléstias malignas que obtém cura de 100% se diagnosticadas em suas formas iniciais. Isto demonstra a necessidade do diagnóstico através das técnicas de biologia molecular consideradas as mais sensíveis, rápidas e específicas existentes.

O desenvolvimento desta pesquisa representará uma nova forma de diagnóstico que auxiliará na detecção da presença do DNA do vírus HPV, possibilitando determinar a carga viral e os tipos de vírus. Entre eles os de alto risco, que acometem cerca de 15% das mulheres normais podendo assim, levar ao desenvolvimento de neoplasias cervicais.

Para realização dos testes genéticos será necessário colher amostras de esfregaço endocervical. Estas amostras serão colhidas pelo médico ginecologista e enviadas ao Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia.

Os resultados obtidos poderão ser divulgados aos pacientes interessados através do médico que os encaminhará ao tratamento adequado. O paciente poderá desistir da pesquisa a qualquer momento sem que haja nenhum prejuízo próprio.

Pelos termos apresentados por este documento, Eu

_____, concordo colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos benefícios, riscos e direitos.

Paciente ou Responsável

Testemunhas

Uberlândia, ____ de _____ de 1999.

